

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
der Universitätskliniken, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh

**Telomeraseaktivitätsmessung mittels Real- Time PCR zur Differenzierung
benigner und maligner Liquorpleozytosen**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES
EINES DOKTORS DER MEDIZIN
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

Vorgelegt 2014
von Dunja Klein (geb. Momber)
geboren in Saarbrücken/Deutschland

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Zusammenfassung | 4 |
| 2. Summery | 5 |
| 3. Einleitung | 6 |
| 3.1 Liquor und Liquorbildung | 6 |
| 3.2 Menigeosis neoplastica | 7 |
| 3.3 Telomerase | 9 |
| 3.3.1 Telomere | 9 |
| 3.3.2 Struktur der Telomerase | 10 |
| 3.3.3 Funktion der Telomerase | 11 |
| 3.3.4 Telomerase in der Tumorgenese | 12 |
| 3.4 Fragestellung | 12 |
| 4. Materialien und Methodik | 13 |
| 4.1 Chemikalien und Kits..... | 13 |
| 4.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 14 |
| 4.3 Lösungen..... | 15 |
| 4.3.1 Complete Medium (CM) zur Zellkultur..... | 15 |
| 4.3.2 Primeransatz für den Master- Mix der Real-Time PCR | 15 |
| 4.3.3 Master-Mix für Real-Time PCR (je gemessene Probe)..... | 15 |
| 4.4 Zelllinien | 16 |
| 4.5 Methoden | 17 |
| 4.5.1 Patienten | 17 |
| 4.5.2 Probenmaterial (asservierter Liquor) | 17 |
| 4.5.3 Zellkultur | 18 |
| 4.5.4 Zellzählung..... | 18 |
| 4.5.5 Proteinisolation | 19 |
| 4.5.6 Versuchsreihen | 20 |
| 4.6 Bestimmung der Telomeraseaktivität | 22 |
| 4.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR); Real-Time- PCR mit Lightcycler® System..... | 22 |
| 4.6.2 Telomerverlängerung - das Prinzip der Telomeraseaktivität..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 4.6.3 Ansatz zur Messung der Telomeraseaktivität | 24 |
| 4.6.4 Detektionsgrenzen..... | 27 |
| 4.7 Statistische Auswertung..... | 27 |
| 5. Ergebnisse | 31 |
| 5.1 Standardkurve der Telomeraseaktivität | 31 |
| 5.2 Telomeraseaktivität bei Meningeosis neoplastica..... | 33 |
| 5.3 Telomeraseaktivität in Zellkulturüberständen..... | 35 |
| 5.4 Stabilität der Telomeraseaktivität während der Präanalytik | 36 |
| 6. Diskussion | 38 |
| 6.1 Messung der Telomeraseaktivität in Liquorproben..... | 39 |
| 6.2 Messung der Telomeraseaktivität in Überständen..... | 43 |
| 6.3 Stabilität der Telomerase während der Präanalytik | 44 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 45 |
| 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 50 |
| 9. Abkürzungsverzeichnis | 51 |
| 10. Danksagung..... | 52 |
| 11. Lebenslauf..... | 53 |

1.Zusammenfassung

Um bei Patienten mit einer zerebralen Erkrankung ein schnelles und effektives Therapieregime einleiten zu können, ist die Liquoranalyse zur Differenzierung benigner und maligner Liquorpleozytose ein wichtiger diagnostischer Untersuchungsbestandteil.

Bei den meisten menschlichen Tumoren kann Aktivität des Enzyms Telomerase festgestellt werden. Diese ermöglicht dem Tumorgewebe aufgrund kontinuierlicher Telomerverlängerung, unbegrenzt zu wachsen.

Moderne Technik ermöglicht es mittels Real-Time PCR eine sensitive und spezifische Analyse der Telomeraseaktivität durchzuführen. Ein positives praeanalytisches Messergebnis korrelierte mit einer Menigeosis neoplastica, jedoch nicht mit benigner Pleozytose (z.B. entzündlichen Erkrankungen). Verglichen wurden die Messergebnisse der analysierten Liquores mit zytopathologischen Begutachtungen.

Die Bearbeitungszeit ist jedoch aufgrund derzeit zur Verfügung stehenden technischen Mitteln begrenzt. Ein Versuch die Telomerase aus Liquorüberständen zu detektieren und somit die Analyse zu verkürzen und vereinfachen war technisch nicht möglich.

Die Telomeraseaktivität kann mittels oben genannten Verfahren zur Differenzierung der Liquorpleozytose genutzt werden und eine schnelle Detektion einer Menigeosis neoplastica gewährleisten.

Somit kann das Verfahren der Telomeraseaktivitätsmessung als klinischer Laborparameter im Routinealltag angewendet werden.

2. Summery

The liquor analysis to differentiate benign and malignant liquor pleocytosis is an important diagnostic parameter to initiated fast and effective therapeutic regimen for patients with cerebral disease.

In most of the human tumors, the active form of the enzyme telomerase can be detected. This facilitates an indefinite growth of the tumor tissue due to continuous elongation of the telomeres and thus ability to proliferate.

Due to modern technology it is possible to perform a sensitive and specific analysis of telomerase activity via Real-Time PCR. A positive pre-analytical result correlated with Menigeosis neoplastica but not with benign pleocytosis (e.g. inflammatory diseases). Furthermore results of telomerase activity correlated with the cytopathological evaluation.

Since process time is still limited due to the currently available technical means, we attempted to detect the telomerase activity in liquor supernatants, and consequently to save process time and to ease the analytical method. However, this was not successful due to technical limitations.

The telomerase activity can be used for the differentiation of the liquor pleocytosis and to assure a rapid detection of Menigeosis neoplastica.

Therefore, the measurement of telomerase activity can be applied as a clinical parameter in the daily laboratory routine.

3. Einleitung

3.1 Liquor und Liquorbildung

Der Liquor cerebrospinalis wird im Plexus choroideus (einem Adergeflecht im Ventrikelsystem) durch Filtration des Blutes mit einer Rate von etwa 0,3 bis 0,4 ml/min gebildet. Von dem Ventrikelsystem aus fließt er durch die Foraminae Magendie in den hinteren und vorderen spinalen Subarachnoidalraum, zurück zu den basalen Zisternen und dem kortikalen Subarachnoidalraum. Die neu gebildete Liquormenge beträgt etwa 500ml/Tag; das bedeutet, der zirkulierende Liquor von etwa 150 ml kann durch Resorption über den Tag etwa dreimal ausgetauscht werden. Die Resorption erfolgt zum einen über Arachnoidalzotten, die mit dem venösen System der Dura mater in Verbindung stehen, zum anderen im Bereich der Wurzeltaschen durch Abfluss in die Peripherie und Resorption über das Lymphsystem. [OSHER 1949]

Lumbalpunktion

Die erste Lumbalpunktion wurde 1891 durch Heinrich Irenäus Quinke nach einer Reihe von Voruntersuchungen in die Klinische Praxis eingeführt.

Heute handelt es sich um eine Routineuntersuchung zur Detektion entzündlicher, maligner oder traumatischer ZNS- Erkrankungen, die in der klinischen Routine etabliert ist. Die Entnahme von Liquor aus dem Wirbelkanal erfolgt mit einer speziellen Hohnadel im Bereich der unteren Lendenwirbelsäule zwischen dem 3./4. bzw 4./5. Lendenwirbel oder suboccipital.

3.2 Menigeosis neoplastica

Die Meningeosis neoplastica tritt bei Tumorpatienten durch die Absiedlung und Ausbreitung maligner Zellen in den Leptomeningen oder durch Aussaat in den Liquor cerebro spinalis auf. Es handelt sich dabei um eine diffuse metastatische Aussaat von Tumorzellen [STRIK, PRÖMMEL 2010]. Durch angrenzende Gefäßversorgung, Migration entlang der Nervenscheiden oder Aussaat angrenzender Tumorabsiedlungen erhalten die Tumorzellen Anschluss an den Liquorraum [THIEL, GLEISSNER 2006]. Die Meningeosis neoplastica wird in Abhängigkeit von der Grunderkrankung mit einer unterschiedlichen Häufigkeit beschrieben. Bei soliden Tumoren (insbesondere bei Melanomen und Mammakarzinomen) sowie diffusen Lymphomen geht man von einer Häufigkeit von 5-10 % aus, bei hirneigenen Tumoren von 1-10%. Bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie beträgt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Häufigkeit einer Meningeosis neoplastica bis zu 10%, bei nachweislichem Rezidiv einer akuten lymphatischen Leukämie sogar 30- 50%! [PAVLIDIS 2003]

Eine Meningeosis neoplastica kann sich auch als Erstmanifestation oder als einzige Lokalisation einer Tumorerkrankung (solitäre Rezidivlokalisierung) darstellen. Häufig ist es jedoch so, dass sich ein menigealer Befall erst im späteren Krankheitsverlauf einer Tumoraussaat zeigt. Etwa ein Drittel bis die Hälfte der Patienten leiden zudem an soliden Hirnmetastasen. [WASSERSTROM et al. 1982].

Bei bekanntem Primärtumor wird gegebenenfalls auch von einer Meningeosis carcinomatosa, sarcomatosa, gliomatosa, leukaemica oder lymphomatosa gesprochen.

Übelkeit, Kopf- und Nackenschmerzen werden häufig als symptomatisches Beschwerdebild beschrieben, zudem kann es zu Ausfällen von Hirnnerven, radikulären Beschwerden, Schmerzen und Paresen kommen.

Nachgewiesen wird die Meningeosis neoplastica initial durch Lumbalpunktion und der neuropathologischen Untersuchung des Liquors, ergänzend gegebenenfalls durch magnetresonanztomographische Untersuchungen. [CHOWDHARY, CHAMBERLAIN 2005]

Aufgrund geringer Passagefähigkeit der Blut-Hirnschranke vieler Zytostatika, werden intrathekale Chemotherapien verabreicht.

Ohne Behandlung liegt die mediane Überlebenszeit bei einigen Wochen (6-10 Wochen). Durch frühzeitige Erkennung und Therapiebeginn mit kombinierter Radio-Chemotherapie (z.B. Metotrexat, Ara-C, Bestrahlung von symptomatischen spinalen Herden oder rasch progrediente Hirnnervenstörungen) kann die mediane Überlebenszeit auf 4-6 Monate, in einigen Fällen auch auf 1 Jahr angehoben werden. Die 1 Jahr- Überlebensrate beträgt in Untersuchungen 5-25%. [BALM, HAMMAK 1996], [DEANGELIS 1998], [GROSSMAN et al. 1993].

Lebensbeschränkend wirken insbesondere die Infiltration des Hirnstammes mit Schädigung lebenserhaltender Zentren sowie eine zunehmende Blockade der Liquorzirkulation (Hydrocephalus).

3.3 Telomerase

Die Telomerase ist ein Ribonukleinkomplex und kann durch Stabilisierung der Telomere deren Verkürzung bei jeder Zellteilung einschränken beziehungsweise aufhalten. Sie stabilisiert das Telomer und kann somit das End- Replikationsproblem und den damit verbundenen Sequenz- oder Zelltod verhindern. [HARLEY 1991], [BODNAR et al. 1998]

3.3.1 Telomere

Der Grund weshalb sich Zellen nicht unendlich teilen können, liegt am Ende der Chromosomen. Dort liegen die sogenannten Telomere (gr. telos= Ende, meros= teilen), die neben der Stabilität der Chromosomen für die Zellalterung verantwortlich sind. [GREIDER 1996]

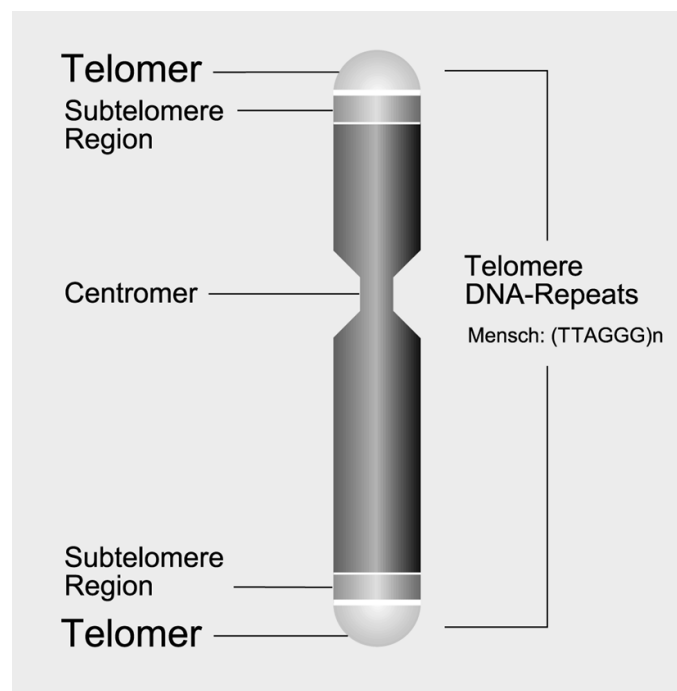


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Metaphasechromosoms mit Telomere

(Quelle: modifiziert nach [DAHSE et al. 1997])

Die Länge der Telomere ist vom Organismus abhängig. Bei Menschen beträgt sie zum Zeitpunkt der Geburt etwa 10 Kilobasen. Telomere enthalten eine repetitive G-reiche Nukleotidsequenz, welche sich am 3'-Ende des parenteralen Einzelstranges befindet. Beim Menschen lautet die Sequenz 5'-TTAGGG-3' und ist nicht an der Gentranskription beteiligt [MOYZIS et al. 1988]. Einige Nukleotide der Telomersequenz gehen bei jeder Teilung verloren. Somit verkürzen sich die Tochterchromosomen bei jedem Teilungsvorgang. Nach signifikantem „Verbrauch“ der Telomere, wird Seneszenz oder der apoptotische Zelltod eingeleitet. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer „mitotischen Uhr“ der Zelle [HARLEY et al. 1990].

3.3.2 Struktur der Telomerase

Die Telomerase wurde 1985 von den Forschern E. Blackburn und C. Greider in Wimperntierchen entdeckt.

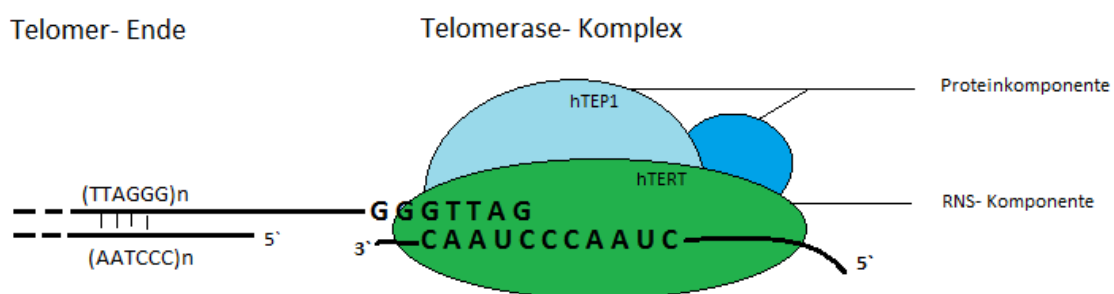


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Telomerase
(Quelle: Modifizierte Darstellung nach [Martens und Lange 2000])

Die Telomerase ist ein Ribonukleinkomplex mit einem Molekulargewicht zwischen 200 und 500 kD [BLACKBURN 1992] und besteht aus einem katalytischen Proteinanteil (hTERT= human telomerase reverse Transcriptase) [NAKAMURA 1997], [MEYERSON et al. 1997] und einem Protein assoziiertem RNS-Anteil (hTR= human telomerase RNA) [FENG et al. 1995], der zur Telomersequenz komplementäre Basenpaare enthält sowie einer regulatorischen Untereinheit (TP1= telomerase- associated protein 1) [HARRINGTON et al. 1997]. Es handelt sich um eine Telomer spezifische reverse Transkriptase, welche die repetitive Telomersequenz bereits als Matrize beinhaltet (d.h. komplementäre Basensequenz zur Telomersequenz). Neben den funktionellen bestehen auch strukturelle Ähnlichkeiten (z.B. sequenzielle Übereinstimmungen in den aktiven Zentren der Enzyme) [NAKAMURA, CECH 1998].

3.3.3 Funktion der Telomerase

Die RNS-Untereinheit (hTR) bindet an die repetitive Telomersequenz der DNS. Durch die katalytische Proteinuntereinheit (hTERT) erfolgt die Anbindung von Nukleotide, was zur Verlängerung der Telomersequenz in 5'-3'-Richtung führt. Im Anschluss kommt es zu einer Polymerisierung des Gegenstrangs.

Bei der DNS-Replikation werden am DNS-Einzelstrang RNS-Primer als Startermoleküle verwendet, an denen eine DNS-Polymerase bindet. Die Synthese der DNS-Polymerase erfolgt grundsätzlich in 5'-3'-Richtung und bildet den komplementären Tochterstrang. [HARLEY 1991] Am Ende der Polymerisation werden die Primer entfernt und durch DNS ersetzt. Am 5'-Ende ist jedoch kein Austausch des Primers durch Nukleotide mehr möglich, da die Polymerase nur in 5'-3'-Richtung synthetisieren kann. [OLOVNIKOV 1973]

3.3.4 Telomerase in der Tumorgenese

In hämatopoetischen Stammzellen, Keimzellen und Embryonalzellen ist Telomerase nachweisbar. [WIDMANN et al. 2005], [HU et al. 1997], [WENG et al. 1997]. Zudem zeigte sich, dass Telomeraseaktivität in 80% aller menschlichen Krebszellen (Malignomen, Präkanzerosen und Dysplasien) nachgewiesen werden kann. Das Enzym liegt hier in einem sehr aktiven Zustand vor. Somit wird eine Schlüsselrolle der Telomerase bei der Immortalisation von Zellen und der Entstehung von Tumoren vermutet [KIM et al. 1994], [SHAY et al. 1997]. Bei Tumorzellen handelt es sich um stark proliferierende Zellen, die aufgrund der Telomerverkürzung besonders schnell vom Zelltod betroffen wären. Mit Hilfe der Telomerase kommt es jedoch zu einer Stabilisierung des Telomers und zur Ausbreitung der Tumorzellen im Körper. Die Tatsache, dass Telomerase bei karzinogenen Prozessen kausal beteiligt ist [SHAY et al. 1997], [GREIDER 1998], eröffnet die Möglichkeit die Telomerase als Tumormarker und als therapeutisches Angriffsziel, zum Beispiel durch Telomeraseinhibitoren, zu verwenden. [DAVIS, SIU 2000]

3.4 Fragestellung

Gegenstand der Arbeit war es herauszufinden, ob die Messung der Telomeraseaktivität in Liquorproben zur Differenzierung benigner und maligner Liquorpleozytose geeignet ist und ob das angewandte Verfahren zur Routinediagnostik eingesetzt werden kann.

4. Materialien und Methodik

4.1 Chemikalien und Kits

| | |
|--|--|
| Firma Braun, Melsungen | Aqua destiliert |
| Firma CHEMICON International, Temecula, USA | CHAPS- Lysis Buffer |
| Firma Eurofins MWG GmbH | Primer (TS, ACX) |
| Firma Fermentas Life science | Ribonuclease Inhibitor (Ribolock™) |
| Firma Gibco, Karlsruhe | Penicillin/ Streptomycin Fetales Kälberserum (FCS) HEK 293 Zellen |
| DSMZ GmbH, Braunschweig | Zelllinien: JURKAT DAUDI L- 540 K- 562 KARPAS- 299 |
| Firma PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich | 1x DDulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS) RPMI 1640 with L- Glutamine |
| Firma Roche, Mannheim | Lightcycler® Fast Start DNA Master SYBR- Green (MgCl ₂ , Aqua destilliert, SYBR- Green) |
| Firma VWK, Darmstadt | Tryptanblau |

4.2 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|------------------------------|--|
| Firma Biometra, Göttingen | Heizblock TRIO- Thermoblock |
| Firma Eppendorf, Leipzig | Automatische Pipettierhilfe „Easypet“ Pipetten „Reference“ Zentrifuge 5415R |
| Firma Heidolph, Kelheim | Vortex Reax 2000 |
| Firma Heraeus, Hanau | Sterilbank HERA safe Brutschrank HERA cell 240 |
| Firma Hermele, Gosheim | Zentrifuge Z 383K |
| Firma Leica, Wetzlar | Mikroskop DMIL |
| Firma Liebherr, Ochsenhausen | Kühlschrank 4°C Gefrierschrank -18°C |
| Firma Nunc, Wiesbaden | -70°C- Kühlschrank Advantage |
| Firma Roche, Mannheim | Lightcycler® Glaskapillaren |
| Firma Starsted, Nümbrecht | Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml Falkons 15ml, 50ml Kulturflaschen Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl |

4.3 Lösungen

4.3.1 Complete Medium (CM) zur Zellkultur

- 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin
- 50 ml Fetales Kälberserum 10%
- 500 ml RPMI 1640 with Glutamine (1x)

4.3.2 Primeransatz für den Master- Mix der Real-Time PCR

- 5 µl ACX- Primer
- 10 µl TS- Primer
- 185 µl Aqua destilliert
- 200 µl Primergemisch

4.3.3 Master-Mix für Real-Time PCR (je gemessene Probe)

- 10,6 µl Aqua destilliert
- 2,0 µl Primer (TS/ACX)
- 0,4 µl 1,5 mM MgCL₂
- 2,0 µl SYBR- Green
- 15 µl Mix je Probe

4.4 Zelllinien

Die in den Versuchsreihen zur Vergleichsmessung der Telomeraseaktivität verwendeten Zellreihen (HEK-293, JURKAT, DAUDI, L-540, K-562 und KARPAS-299), sind in Tabelle 1 aufgeführt.

| Zelllinie | Zelltyp | Ursprung |
|------------------|---------------------|--|
| HEK 293 | Embryonale Niere | Etabliert aus einer embryonalen menschlichen Niere, umgewandelt mittels Adenovirus 5 |
| JURKAT | T- Zell Leukämie | Entwickelt aus dem peripheren Blut eines 14 jährigen Patienten mit ALL und erstem Rezidiv |
| DAUDI | Burkitt Lymphom | Entwickelt aus dem Burkitt Lymphom eines 16 jährigen Patienten, EBV positiv und mRNA- Expression für Protooncogen BCL2 |
| L-540 | Hodgkin Lymphom | Entwickelt aus dem Knochenmark einer 20 jährigen Patientin mit Hodgkin Lymphom |
| K-562 | CML in Blastenkrise | Entwickelt aus Pleuraflüssigkeit einer 53 jährigen Patientin mit CML; die Zellen tragen das Philadelphiachromosom mit BCR-ABL b3a2 Gen |
| KARPAS-299 | T-Zell Lymphom | Entwickelt aus dem peripheren Blut eines 25 jährigen Patienten mit T-Zell Non- Hodgkin Lymphom. CD30+ anaplastisches Großzelllymphom. Die Zellen tragen das NPM-AK Gen |

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Zelllinien der Versuchsreihen

CML= Chronische myeloische Leukämie

ALL= Akute lymphatische Leukämie

EBV= Epstein- Barr Virus

4.5 Methoden

4.5.1 Patienten

Die Genehmigung zur Gewinnung und Verarbeitung der Proben sowie die Speicherung der Messergebnisse und der Patientendaten wurden bei der lokalen Ethikkommission beantragt und bewilligt. Von den Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten wurde vor Lumbalpunktion eine Einwilligungserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung des entnommenen Liquors unterschrieben.

Es wurden 72 männliche und 39 weibliche Patientenproben untersucht, wobei 89 Proben von Erwachsene und 22 Proben von Kindern (unter oder gleich 18 Jahren) waren. Das Durchschnittsalter der erwachsenen Patienten lag bei 49,1 Jahren (ältester Patient 83 Jahre und jüngster Patient 22 Jahre), das Durchschnittsalter der Kinder lag bei 6,3 Jahren (ältester Patient 18 Jahre, jüngster Patient 1 Monat).

4.5.2 Probenmaterial (asservierter Liquor)

Bei dem verwendeten Probenmaterial handelte es sich um Liquores die im Rahmen einer Routinepunktion im Zeitraum von 2006 bis 2008 entnommen wurden. Die Lumbalpunktion wurde in der Inneren Medizin I (Onkologie, Hämatologie, Klin. Immunologie und Rheumatologie), Klinik für pädiatrische Onkologie und Hämatologie und in der Klinik für Neurologie der Universitätsklinik des Saarlandes sowie der medizinischen Klinik der Charité in Berlin zur Differentialdiagnostik bzw. zur Verlaufskontrolle cerebraler Prozesse durchgeführt. Das Probenvolumen umfasste mindestens 1 Milliliter.

Für weitere Analysen und Aufbereitung der Probe wurde mittels Zellzählung im Zentrallabor die Zellzahl der Probe ermittelt.

Spätestens 30 Minuten nach Entnahme der Liquorprobe wurde diese, bei 3200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet trocken pipettiert. Zellpellet und Überstand der Liquorproben wurden getrennt bei -80°C bis zur Analyse und Proteinisolation konserviert.

4.5.3 Zellkultur

Die Zellkultur dient zur Kultivierung und Vermehrung von Einzelzellen, die aus verschiedenen Geweben gewonnen werden können. Im Inkubator werden durch optimale Umgebungsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Gehalt), einer geeigneten Oberfläche zur Anheftung der Zellen sowie einem Nährmedium, optimale Kultivierungsbedingungen geschaffen. Zum vitalen Erhalt der Zellen ist ein regelmäßiges Splitten und Erneuern des Nährmediums notwendig.

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um Suspensionskulturen, die mit entsprechendem Complete medium (Penicillin/ Streptomycin, Fetales Kälberserum, RPMI 1640 with Glutamine) genährt wurden. Die Umgebungstemperatur im Brutschrank betrug 37°C bei 5% CO₂ der Umgebungsluft. Eine Teilung der Zellkultur erfolgte zweimal wöchentlich.

4.5.4 Zellzählung

Zellkultur:

Die Durchführung der Zellzählung erfolgte anhand einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop. Die Kammer und das Deckglas wurden vor Gebrauch gereinigt um frei von Staub, Fusseln und vor allem frei von Zellen zu sein. Danach wurde das Deckglas auf beide Trägerstege aufgeschoben.

Mittels 0,3 prozentiger Trypanblaulösung (10µl) und Zellsuspension (10µl) wurde ein Gemisch im Verhältnis 1:1 hergestellt und bei aufgelegtem Deckglas

seitlich aufpipettiert. Aufgrund vorherrschender Kapillarkraft saugte sich die Zellsuspension in die Zwischenräume. Anschließend wurden zweimal 16 Felder vitale Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt und der Mittelwert gebildet. Tote Zellen, welche sich aufgrund einer defekten Zellmembranbarriere mit Trypanblau anfärbten, wurden nicht berücksichtigt.

Das entsprechende Volumen mit einer Million Zellen wurde 7 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet im Anschluss möglichst trocken pipettiert. Danach wurden das Zellpellet und der Überstand getrennt bei -80°C bis zur Proteinisolation und Analyse asserviert.

Liquorproben:

Die Zellzählungen der Liquorproben wurden im Zentrallabor durchgeführt.

Zur Anfärbung der Zellen wurden in einer Leukozytenpipette Liquor mit Gentaviolettlösung (10 Teile Liquor und 1 Teil Farbe) gemischt. Der gefärbte Liquor wurde in eine Fuchs- Rosenthal- Zählkammer mit 3,2µl Inhalt gegeben. Die gezählten Zellen aller 16 mal 16 Zellquadrate des Zählfeldes entsprechen der Zellzahl pro 3µl.

4.5.5 Proteinisolation

Die trocken pipettierten Zellpellets der HEK 293 Zellen der Zellkultur wurden in 200µl Chapspuffer und 4µl RNase-Inhibitor im Verhältnis 1:50 resuspendiert, welcher einen Schutz vor dem vorzeitigen Abbau durch kontaminierende Nukleasen geben soll. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 min bei 4°C. Nach Inkubation wurde die Zellsuspension bei 4°C und 3200 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand mit enthaltenem Proteinlysats abpipettiert, danach je 10µl weise aliquotiert und anschließend bei -70°C tiefgefroren. 10µl eines Aliquots entsprachen einer äquivalenten Menge Protein von 50.000 Zellen.

Bei den Liquorproben wurden die Zellpellets entsprechend der Zellzahl mit Chapspuffer resuspendiert, sodass sich in 5µl Chapspuffer 1000 Zellen befanden. Somit wurde sichergestellt dass die gleiche Menge an Zellzahl eingesetzt wurde um die Messungen vergleichbar zu machen.

RNase-Inhibitor wurde im Verhältnis 1:50 hinzu gegeben. Es folgte die Inkubation über 30 min bei 4°C und im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 4°C und 3200 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand mit Proteinlysate wurde abgenommen und aliquotiert und bei -70°C bis zur Analyse tiefgefroren.

4.5.6 Versuchsreihen

Um den linearen Bereich des Versuchsaufbaus zu gewährleisten erfolgte zunächst mittels Zellkultur die Erstellung einer Eichkurve zur Telomeraseaktivität. An diese Eichkurve angelehnt konnten die Telomeraseaktivität der Liquorproben ausgewertet werden.

Zur möglichen Etablierung eines diagnostischen Routineparameters ist es darüber hinaus von Interesse die Stabilität der Telomeraseaktivität unter verschiedenen Bedingungen zu ermitteln. Das bedeutet: inwieweit verändert sich die Telomeraseaktivität wenn die Proben oder die daraus extrahierten Proteinlysate über einen definierten Zeitraum bei Zimmertemperatur (21°C) bzw. im Kühlschrank (4°C) lagern?

Dazu wurden 1000 Zellen sowie das äquivalente Proteinlysate von 1000 Zellen über 0 bis 48 Stunden bei 21°C beziehungsweise 4°C gelagert. Die Messung der Telomeraseaktivität erfolgte jeweils nach 1h, 6h, 10,5h, 24h und 48h.

Neben der Stabilität interessierte zudem, ob Telomeraseaktivität auch in den Überständen der Liquores nachgewiesen werden kann, um eventuell eine Zeitersparnis im Routineprozess erzielen zu können.

Verdünnungsreihe

Um eine Standardkurve darstellen zu können, wurde mittels tiefgefrorenem Proteinlysate aus den HEK 293 Zellen, eine Verdünnungsreihe hergestellt. Mit Hilfe der Standardkurve konnte im Verlauf eine Relation der Liquorproben zu den Ergebnissen der Standardkurve gesetzt werden und somit zwischen positiven und negativen Messergebnissen unterschieden werden.

Zur Ermittlung einer Standardkurve wurden in Bezug auf vorangegangene Studien [KLEINSCHMIDT-DEMASTER et al. 1998] HEK 293 Zellen gewählt, da sich hier bereits in mehrfachen Experimenten eine gut reproduzierbare und stabile Telomeraseaktivität nachweisen ließ.

Um die erste Verdünnungsstufe zu erreichen wurden aus 10µl eines Aliquots mit einer äquivalenten Menge an Protein aus 50.000 Zellen 5µl entnommen und mit 120µl destilliertem Wasser verdünnt. Somit erhielt man eine Lösung mit 125µl und Protein aus 25.000 Zellen, was einer Verdünnung von 1:25 entsprach. In 5µl dieser Verdünnungsstufe befanden sich 1000 Zellen.

Jede weitere Verdünnung entstand durch Verdünnung der Vorstufe (5 µl der Vorstufe und 5 µl destilliertes Wasser).

Der Messbereich erstreckte sich von 1000 Zellen bis zu 0 Zellen.

| | | | | | | | | |
|------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Verdünnungsstufe | 1:25 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 | 1:1600 | 1:3200 |
| Zellzahl in 5 µl | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62 | 32 | 16 | 8 |

Tabelle 2: Verdünnungsreihe

Mit Hilfe der Standardkurve aus HEK293- Zellen erfolgte eine vergleichende Quantifizierung. Die Detektionsgrenze lag bei 8 Zellen, d.h. als positiv wurden die Proben gewertet, deren Telomeraseaktivität größer oder gleich der Telomeraseaktivität von 8 HEK 293 Zellen war.

4.6 Bestimmung der Telomeraseaktivität

4.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR); Real-Time- PCR mit Lightcycler® System

Die Messung der Telomeraseaktivität basierte auf einer Real- Time PCR, da zur Messung der Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von der Zellzahl ein quantitativer Nachweis notwendig war. Verwendet wurde ein LightCycler®- System, welches auf die benötigten Temperaturen der jeweiligen Reaktionsschritte programmiert wurde. Der Vorteil gegenüber den älteren Verfahren liegt im Verzicht auf radioaktiv- markierte Komponenten, einer deutlich verkürzten Analysezeit sowie einer verbesserten Sensitivität und Effektivität [HOU et al. 2001].

Nach der Initialisierung (Hitzeinaktivierung der Telomeraseaktivität, Start der hitzestabilen Fast- Taq DNA- Polymerase und lösen von Doppelsträngen) erfolgten 36 Amplifikationszyklen, welche sich im Einzelnen wie folgt darstellten:

| Analyse Modus | Zyklen | Segment | Target temperatur | Dauer |
|----------------------|--------|---------------|-------------------|---------|
| Inkubation | | | | |
| Keine | 1 | | 95°C | 10 min. |
| Amplifikation | | | | |
| Quantifizierung | 36 | Denaturierung | 95°C | 20 sec. |
| | | Annealing | 60°C | 30 sec. |
| | | Elongation | 72°C | 50 sec. |

Tabelle 3: Ablauf der Lighcycler® PCR

Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die am Ende der Elongation in jedem PCR- Zyklus durchgeführt werden.

Der fluoreszierende Farbstoff (z.B. SYBR Green I) hat die Fähigkeit sich in die doppelsträngige DNS einzulagern, ohne eine wesentliche Veränderung der ursprünglichen DNS-Struktur zu bewirken, das heißt er interkaliert. Nur in dieser Verbindung entsteht eine messbare Fluoreszenz, da der fluoreszierende Farbstoff in freier Lösung nicht messbar ist. In der exponentiellen Phase der PCR kommt es zu einem proportionalem Fluoreszenzanstieg, sodass unter Vergleich einer Standardkurve, die Menge der entstehenden DNS bestimmt werden [ZIPPER et al. 2004] und somit die Aktivität der Telomerase ermittelt werden kann.

Die Quantifizierung des PCR Produktes erfolgt in Glaskapillaren (fluorimetrische Bestimmung). Das optische System besteht aus einer blauen Licht emittierenden Diode (LED) als Energiequelle, die mit einer Wellenlänge von maximal 470 nm die Proben zur Fluoreszenz anregt. Das emittierte Licht der Proben wird über einen Spiegel über verschiedene Analysekanäle in den Photometer reflektiert. Hier wird die emittierte Wellenlänge der Probe analysiert. [WITTWER et al. 1997a], [WITTWER et al. 1997b], [ROCHE LIGHT CYCLERS® OPERATER`S MANUAL]

4.6.2 Telomerverlängerung - das Prinzip der Telomeraseaktivität

Bei vorhandener Telomeraseaktivität erfolgte während der Inkubationsphase (30 Minuten bei 30 °C auf einer Wärmebank) die Telomerverlängerung.

Die RNS-Untereinheit (hTR) des Enzyms band an die telomerähnliche Sequenz der Primer TS (Sequenz: 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3', KIM et al. 1997) und ACX (Sequenz: 5'-GCGCGG[CTTACC]₃CTAACC-3', KIM et al. 1997). Durch die katalytische Proteinuntereinheit (hTERT) erfolgte die Anbindung von Nukleotiden, was zur Verlängerung der Sequenz in 5'-3'-Richtung führt. Im Anschluss kam es, analog zur Telomerasefunktion in vivo, zur Bildung des Gegenstranges.

Die quantitative Verlängerung des Templates entspricht der quantitativen Telomeraseaktivität. Somit wurde die Enzymaktivität gemessen.

Die Glaskapillaren wurden direkt nach Inkubation ohne weitere Zeitverzögerung in das LightCycler®-System überführt. Das eingestellte Programm mit oben definiertem Ablauf wurde gestartet.

Mittels initialer Erhitzung (95° Celsius für 10 Minuten) im LightCycler®-System kam es zur irreversiblen Denaturierung der Proteinuntereinheit der Telomerase, wodurch eine weitere Telomerverlängerung vermieden wurde. Gleichzeitig wurde die im FastStart Mix enthaltende Polymerase aktiviert.

4.6.3 Ansatz zur Messung der Telomeraseaktivität

Versuchsaufbau:

Zur Bestimmung der Telomeraseaktivität wurde das "SYBR-Green real time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity" [WEGE et al. 2002] zugrunde gelegt.

Hier konnte eine Gesamtanalysezeit von 3 Stunden (inklusive der Proteinisolation) und eine reine Arbeitszeit von 20 Minuten beschrieben werden. Zusammengesehen war dies, im Hinblick auf die mögliche Einführung eines Routineverfahrens, von großem Interesse.

Die Durchführung der Real-Time PCR zur Bestimmung der Telomeraseaktivität erfolgte in einem Lightcycler®-System. Zunächst wurde ein Reaktionsansatz mit allen für die PCR notwendigen Reagenzien pipettiert.

Um das Rückkontaminationsrisiko durch PCR-Produkte zu minimieren wurde eine strikte räumliche Trennung von PCR-Maschine, Endprodukten und Pipettensatz eingehalten. Ein Vorteil des Lightcycler®- System besteht darin, dass aufgrund verschlossener Glaskapillaren ein Übertragungskontamination reduziert werden kann.

Um die Telomeraseaktivität der äquivalenten Menge an Protein einer bestimmten Zellzahl einer gewünschten Zelllinie zu messen, wurde mit Hilfe eines Kits von der Firma Roche® ein Mastermix, für das Lightcycler®- System hergestellt. Dazu wurden Lightcycler® FastStart DNA Master SYBR-Green I für PCR (enthält FastStart Taq DNA-Polymerase, SYBR-Green, Reaktionspuffer, einen Oligonukleotidmix und Magnesiumchlorid), destilliertes Wasser sowie die Primer TS (Sequenz: 5`-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3`, KIM et al. 1997) und ACX (Sequenz: 5`-GCGCGG[CTTACC]₃CTAACC-3`, KIM et al. 1997) in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Der verwendete Primer ACX (Sequenz: 5`-GCGCGG[CTTACC]₃CTAACC-3`, KIM et al. 1997) besitzt einen 6 Basenpaare „Anker“ am 5`- Ende welcher weder der Telomersequenz zugehörig ist, noch zu einer Telomersequenz komplementär ist. Wir verwendeten ACX und TS Primer, da diese beiden zusammen die geringsten PCR Primer-Dimer Artefakte bildeten. Zudem konnten in herkömmlichen PCR-Methoden die Primer-Dimer

Artefakte aufgrund ihres Bandenmusters eindeutig zu den Telomerasesequenzen unterschieden werden. [KIM, WU 1997]

Ansatzprotokoll:

- 10,6 µl Aqua dest. (PCR Grade)
- 2,0 µl Primergemisch (enthält 0,1 µg TS und 0,05 µg ACX)
- 0,4 µl MgCl₂ (1,5mM)
- 2,0 µl LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR Green

außerdem wurde hinzugefügt:

- 5,0 µl Proteinlysat der zu untersuchenden Liquorprobe oder der jeweiligen Verdünnungsstufe einer Zelllinie aus Zellkultur beziehungsweise Überstand (nach Abzentrifugieren des Zellpellets)

Alternativ wurde anstelle des Proteinlysates hinzugegeben:

- 5,0 µl HEK 293 Zellen (1000Zellen) Positivkontrolle mit Telomeraseaktivität
- 5,0 µl HEK 293 Zellen (1000 Zellen) hitzeinaktiviert; Negativkontrolle ohne Telomeraseaktivität

Es wurden je 15µl Mastermix und 5µl des zu messenden Reagenz in eine Glaskapillare pipettiert, wobei jede Probe doppelt bestimmt wurde. Die Doppelbestimmung diente der Selbstkontrolle und nachweislichen Reproduzierbarkeit der Messungen.

4.6.4 Detektionsgrenzen

Mit Hilfe der erstellten Verdünnungsreihe (von 0 bis 1000 Zellen) aus HEK- 293 Zellen, konnte eine Standardkurve erhoben werden, wobei in wiederholten Versuchen reproduzierbar, die untere Detektionsgrenze bei 8 von 1000 Zellen lag. Dies wurde in Vorversuchen ermittelt.

Ein positives Ergebnis wurde angenommen, wenn der Schwellenwert der Proben (d.h die Zykluszahl bei der erstmals ein messbares PCR-Produkt im Rahmen der Amplifikation auftrat) über der dritten Standardabweichung des Mittelwertes aller Negativkontrollen lag. Somit wurde das kleinste messbare Ergebnis als relative Telomeraseaktivität von 1% definiert (was etwa einer äquivalenten Menge Proteinlysate aus 10 von 1000 Zellen entspricht). Die Quantifizierung der Telomeraseaktivität der gemessenen Lösungen konnte relativ zu den HEK-293 Zellen angegeben werden.

Hitzeinaktivierte Proteinlysate von 1000 HEK-293 Zellen, CHAPS-Puffer und destilliertes Wasser wurden als Negativkontrollen eingesetzt, aktiviertes Proteinlysate von 1000 HEK-293 Zellen als Positivkontrolle.

Zur Bestimmung der Zellzahl anhand der SYBR- Green Fluoreszenz erfolgte eine Umrechnung anhand Standardkurve ($R^2 = 0,9958$). [WIDMANN et al. 2007]

4.7 Statistische Auswertung

Grafiken und statistische Analysen wurden mittels SigmaPlot und SigmaStat (beide von Firma SPSS Inc., Chicago, USA) und MS Excel angefertigt.

Die Korrelation zwischen der Telomeraseelongation und der Anzahl der Zykluszahl wurde mittels einer linearen Regressionsanalyse bestimmt.

In der einfachen (bivariaten) linearen Regressionsanalyse wird der Einfluss einer unabhängigen Variablen X (Telomeraseaktivität) auf eine abhängige

Variable Y (Zyklenzahl) untersucht. Die Kausalitätsrichtung (Bestimmung der Variablen als unabhängig, bzw. abhängig) wird theoretisch festgelegt und geht der Regressionsanalyse voraus. Des Weiteren wird eine lineare Beziehung zwischen der beziehungsweise den unabhängigen Variable(n) und der abhängigen Variable vorausgesetzt. [BALTES-GÖTZ, 2005], [TAHA 2006]

Um die Korrelation der Telomeraseaktivität in Abhängigkeit der Zellzahl von Zellkultur und Liquorproben zu ermitteln, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient als dimensionsloses Maß für den linearen Zusammenhang ermittelt.

Die Unterschiede der Telomeraseaktivität von Proteinlysat und Überstand aus Zellkultur wurden unter Zuhilfenahme des t-Testes für unverbundene Stichproben analysiert. Hierbei wurden die beiden Stichprobenmittelwerte verglichen.

Die univariate Varianzanalyse wurde für die Analyse der Telomeraseaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Experimentes zur Präanalytik verwendet. Das heißt es wurde untersucht, ob die Varianz (= Streuung der Werte relativ zum Erwartungswert) zwischen den Gruppen größer war als die Varianz innerhalb der Gruppen. Somit kann bei signifikanten Unterschieden von unterschiedlichen Gesetzmäßigkeiten in den Gruppen ausgegangen werden.

Zur Bestimmung der Prävalenz von Spezifität und Sensitivität wurde eine 4 Feldertafel (Kontingenztafel) herangezogen. Hierbei handelt es sich um die Beurteilung eines Klassifikators. Die Patienten werden in „krank“ (positiv) und „gesund“ (negativ) eingeteilt. Demnach soll mit dem Test beurteilt werden, wie gut die Messung der Telomeraseaktivität in Liquorproben als Laborparameter geeignet ist. Es gibt folgende mögliche Ergebnisse:

1. **Richtig positiv:** Der Patient ist krank, und der Test hat dies richtig angezeigt.
2. **Falsch negativ:** Der Patient ist krank, aber der Test hat ihn fälschlicherweise als gesund eingestuft.
3. **Falsch positiv:** Der Patient ist gesund, aber der Test hat ihn fälschlicherweise als krank eingestuft.
4. **Richtig negativ:** Der Patient ist gesund, und der Test hat dies richtig angezeigt.

An Hand der sogenannten Kontingenztafel (4 Feldertafel) können nun Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert abgelesen werden. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ($p < 0.05$) festgelegt.

| | Person ist krank ($r_p + f_n$) Person ist gesund ($f_p + r_n$) | |
|------------------------------|---|---------------------------|
| Test positiv ($r_p + f_p$) | richtig positiv (r_p) | falsch positiv (f_p) |
| Test negativ ($f_n + r_n$) | falsch negativ (f_n) | richtig negativ (r_n) |

Sensitivität (auch Richtig-Positiv-Rate) entspricht dem Anteil an tatsächlich Kranken, bei denen die Krankheit auch erkannt wurde.

$$P(\text{positiv erkannt} / \text{tatsächlich positiv}) = \frac{rp}{rp + fn}$$

Die **Spezifität** (auch Richtig-Negativ-Rate) gibt den Anteil der Gesunden an, bei denen auch festgestellt wurde, dass keine Krankheit vorliegt.

$$P(\text{negativ erkannt} / \text{tatsächlich negativ}) = \frac{rn}{rn + fp}$$

Der **positive prädiktive Wert** (positiver Vorhersagewert) gibt an, wie viele Personen, bei denen die Krankheit festgestellt wurde, auch tatsächlich krank sind.

$$P(\text{richtig positiv erkannt/positiv erkannt}) = \frac{rp}{rp + fp}$$

(In Anlehnung an [DIETTERICH 1998])

Die Standardkurve der HEK 293 Zellen zeigte eine logarhythmische Beziehung von Zellzahl zu PCR Produkt (entsprechend Telomeraseaktivität) innerhalb von 2 Logstufen ($R^2 = 0,9958$) nach der Formel $y = y_0 * \ln(a)^{-x}$. y_0 entsprach dabei der Zyklenzahl bei 0 HEK 293 Zellen, x der zu errechnenden Zellzahl, y der gemessenen Zyklenzahl während der PCR und a der Geradensteigung. Nach Auflösung der Gleichung nach x konnte anhand der für jede Probe gemessene Zyklenzahl im Rahmen der PCR, die Telomeraseaktivität der Probe im Verhältnis von HEK293 Zellen gleicher Zyklenzahl bestimmt werden. [WIDMANN et al. 2007]

5. Ergebnisse

5.1 Standardkurve der Telomeraseaktivität

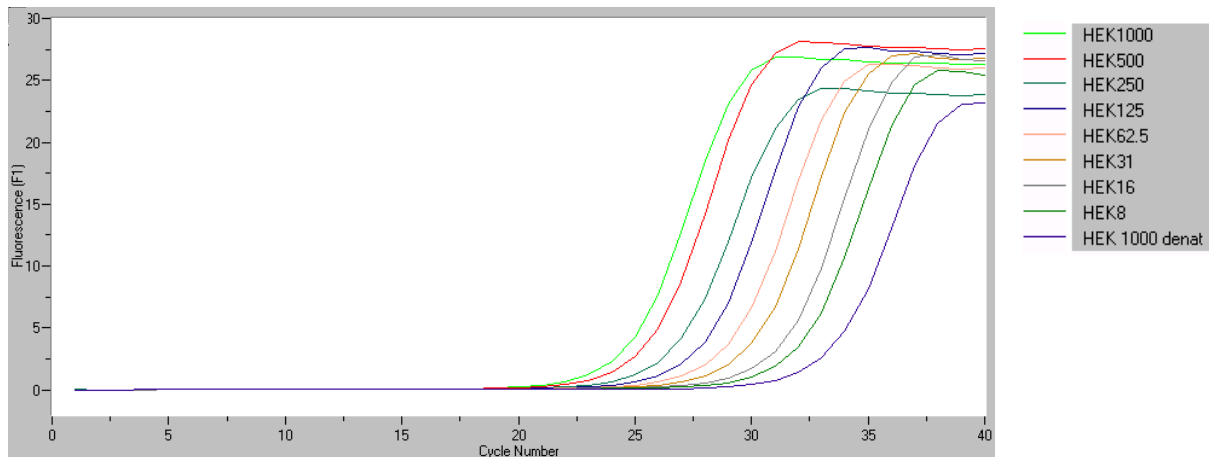


Abbildung 3: Telomeraseaktivitätsmessung einer Verdünnungsreihe mit HEK 293- Zellen.

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus HEK-293 Zellen wurde eine Standardkurve ermittelt, um anhand einer gemessenen Telomeraseaktivität eine spätere Quantifizierung vorzunehmen. Die in Abbildung 3 dargestellten verschieden farbigen Kurven spiegeln die unterschiedlichen Stufen der Verdünnungsreihe wider. Auf der x- Achse stellt sich die Zykluszahl der PCR dar, auf der y- Achse wird die messbare Fluoreszenz abgebildet. Die Wendepunkte der Kurven zeigen an, nach wie vielen Zyklen eine signifikante Menge SYBR-Green im relevanten Maße detektiert wird, d.h. ab welchem Punkt das amplifizierte Produkt detektiert wird. Somit konnte ein Korrelationskoeffizient ermittelt werden, welcher eine sehr hohe Korrelation zwischen Zykluszahl und Zellzahl widerspiegelt. Dies bedeutet je mehr Zellen eingesetzt wurden, desto höher war die Telomeraseaktivität und desto weniger Zyklen wurden benötigt um SYBR Green zu detektieren.

Nach Messung der Telomeraseaktivität einer Verdünnungsreihe aus HEK-293 Zellen, wurde pro Verdünnungsstufe der Mittelwert der PCR-Zykluszahl (x-Achse) gegen die jeweilige Verdünnungsstufe (y-Achse) aufgetragen. Es entstand eine Kurve, welche die Beziehung der eingesetzten HEK-Zellen zum Auftreten der PCR Produkte anhand der Zykluszahl während der Real-Time PCR widerspiegelt. Somit konnte die Standardkurve zur Quantifizierung der klinischen Proben herangezogen werden konnte.

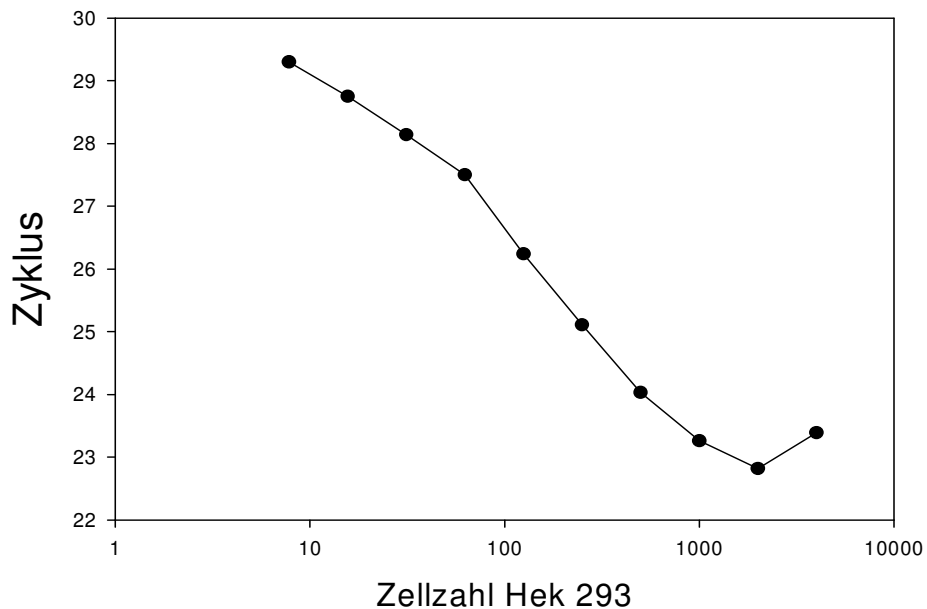


Abbildung 4: Darstellung der Standardkurve als logarithmische Beziehung von Zellzahl zu PCR-Produkt. $y = y_0 * \ln(a)^{-x}$

5.2 Telomeraseaktivität bei Meningeosis neoplastica

Es wurden insgesamt 111 Liquorproben mittels Lightcycler®-System hinsichtlich möglicher Telomeraseaktivität analysiert, die sich wie folgt in drei klinische Gruppen unterteilen ließen. Die Gruppierung erfolgte anhand des histopathologischen Befundes:

Liquorpleozytose :

- Tumore **mit** meningealen Befall (n= 15)
- Tumore **ohne** meningealen Befall (n= 57)
- ohne Tumorerkrankung (n= 39)

| Tumore mit meningealen Befall (n=15) | Tumore ohne meningealen Befall (n= 57) | Krankheitsbilder ohne Tumorbeteiligung (n= 39) |
|--|--|---|
| Diagnosen | | |
| DLBCL (n=13) ALL (n= 1) Astrozytom (n=1) | DLBCL (n=19) ALL (n=14) Peripheres T-NHL (n= 3) Follikuläres Lymphom (n=3) AML (n=3) Burkitt Lymphom (n=2) Mantelzell Lymphom (n=2) Anaplastisches T- NHL (n=2) Medulloblastom (n=2) Seminom (n=2) B-CLL (n=1) Lymphoplasmacytoides Lymphom (n=1) Sarkom (n=1) Brustkrebs (n=1) | Intraventrikuläre Blutung (n=9) SAB (n=6) Virale Meningitis (n=5) Hydrocephalus occlusus (n=4) Spinalkanalstenose (n= 3) Shuntinfektion (n=3) Bakterielle Meningitis (n=2) Ideopatische Fazialis pares (n= 2) Pilzmeningitis (n=1) Multiple Sklerose (n= 1) Duraler Abszess (n=1) Encephalomyelitis (n=1) Spondylodizitis (n=1) |

Tabelle 4: Krankheitsbilder der Liquores

Abkürzungen:

DLBCL= Diffuses großzelliges B- Zell Lymphom, NHL= Non- Hodgkin- Lymphom, ALL= akute lymphatische Leukämie, AML= akute myeloische Leukämie, CLL= chronisch lymphatische Leukämie, SAB= Subarachnoidalblutung,

In 15 Fällen wurde eine Telomeraseaktivität nachgewiesen. Ein negatives Ergebnis (= fehlende Telomeraseaktivität) korrelierte mit benigner Liquorpleozytose in 95 Fällen.

Die Messung der Telomeraseaktivität mittels LightCycler®- System zeigte bei Korrelation mit dem neuropathologischen Befund, eine Sensitivität von 100% (15/15 Proben) und eine Spezifität von 98,9% (95/96 Proben).

| | Menigeosis neoplastica (n) | Keine menigeosis neoplastica (n) |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Telomeraseaktivität (n) | 15 | 1 |
| Keine Telomeraseaktivität (n) | 0 | 95 |
| Summe (n) | 15 | 96 |

Tabelle 5: Vierfeldertafel der Versuchsreihen

Die 15 positiv gemessenen Proben (Telomeraseaktivität vorhanden), wurden neuropathologisch als Menigeosis neoplastica bestätigt.

Lediglich bei einer Liquorprobe mit erhöhter Telomeraseaktivität konnte neuropathologisch keine Menigeosis neoplastica nachgewiesen werden.

In diesem Fall handelte es sich um einen 6-jährigen männlichen Patienten, der sich klinisch in Remission eines T- Zell Non Hodgkin Lymphoms befand und zwei Wochen vor der Liquorentnahme eine prophylaktische intrathekale Metothrexat- Applikation erhielt. Die Routinepunktion des Patienten zeigte eine erhöhte Zellzahl (23/ μ l), in Verbindung mit einem erhöhten Proteingehalt (2,53 g/l). Es gab keine klinischen Anzeichen einer Infektion oder einer

menigealen Aussaat. Der Patient entwickelte auch im Verlauf keine Meningeosis neoplastica und blieb in vollständiger Remission.

Zusammenfassend ergab sich ein positiv prädiktiver Wert von 0,94 und ein negativ prädiktiver Wert von 1,0 für die Diagnose einer Meningeosis neoplastica. Somit zeigte sich eine hohe Spezifität zwischen der quantitativen Messung der Telomeraseaktivität und der Diagnose der Meningeosis neoplastica, was mit einer hohen Signifikanz ($p < 0,001$) assoziiert war.

5.3 Telomeraseaktivität in Zellkulturüberständen

Ein weiteres Ziel bestand darin die Komplexizität der Analyse zu vereinfachen und die Analysezeit von Liquorproben zu verkürzen. Wir untersuchten, ob die Telomeraseaktivität auch im Überstand von Liquorproben und Zellkultur detektiert werden kann.

Abbildung 5 zeigt eine messbare Telomeraseaktivität in Überständen bei 4 von 5 Zelllinien. Angegeben wurden die Ergebnisse als „relative Telomeraseaktivität (%)“ im Verhältnis zur Telomeraseaktivität des Proteinlysates von HEK-293 Zellen. Im Vergleich zur Messung des Proteins der entsprechenden Zellreihe zeigten sich ein deutlich geringeres Aktivitätsniveau, ($p = 0,03$).

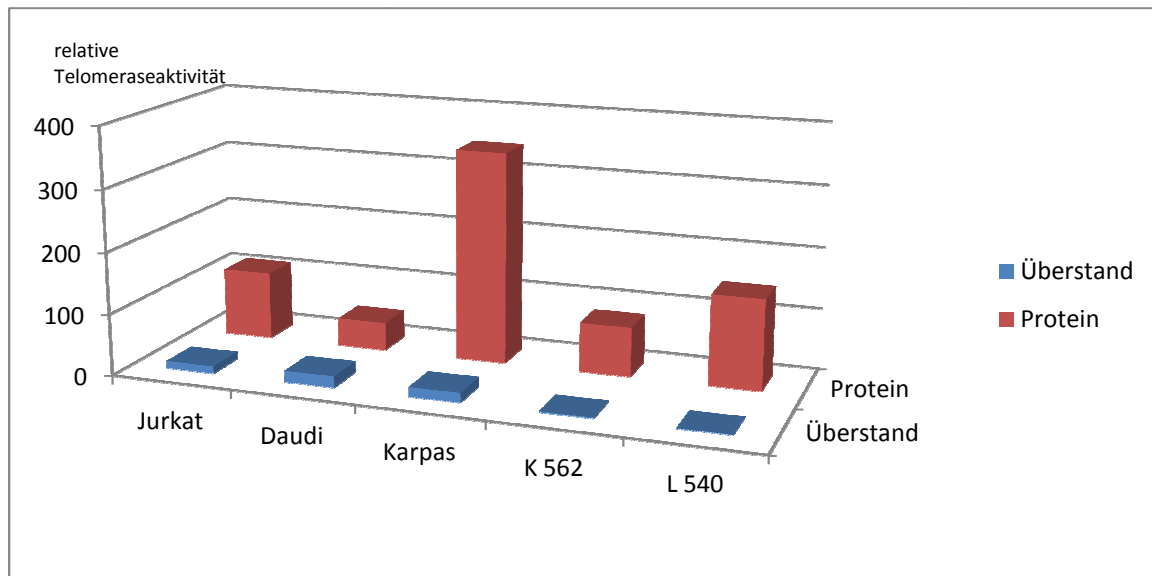


Abbildung 5: Telomeraseaktivitätsmessung aus Überständen verschiedener Zelllinien (n=5) aus Zellkultur.

Die aus Zellkultur erhobenen Messergebnisse konnten jedoch nicht auf Liquorproben übertragen werden. In keinem der Überstände der 15 Proben von Patienten mit Menigeosis neoplastica konnte eine Telomeraseaktivität detektiert werden.

5.4 Stabilität der Telomeraseaktivität während der Präanalytik

Um den klinischen Alltag zu simulieren (Verzögerungen auf Station oder im Labor bis zur Aufbereitung der Liquorproben) und um eine Stabilität der Telomeraseaktivität bei Raumtemperatur zu untersuchen, wurde eine Messreihe mittels HEK-293 Zellen und Proteinlysate aus HEK-293 Zellen zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 10,5h, 24h und 48h nach Entnahme aus der Zellkultur durchgeführt.

Es zeigte sich eine Stabilität der Telomeraseaktivität innerhalb vitaler Zellen bei Raumtemperatur. Eine Inkubation des Proteinlysates bei Raumtemperatur

zeigte eine zeitabhängige schnelle Abnahme der Telomeraseaktivität ($p < 0,001$). Die Versuchsreihe bestand aus 3 fach gleicher Proteinmessung.

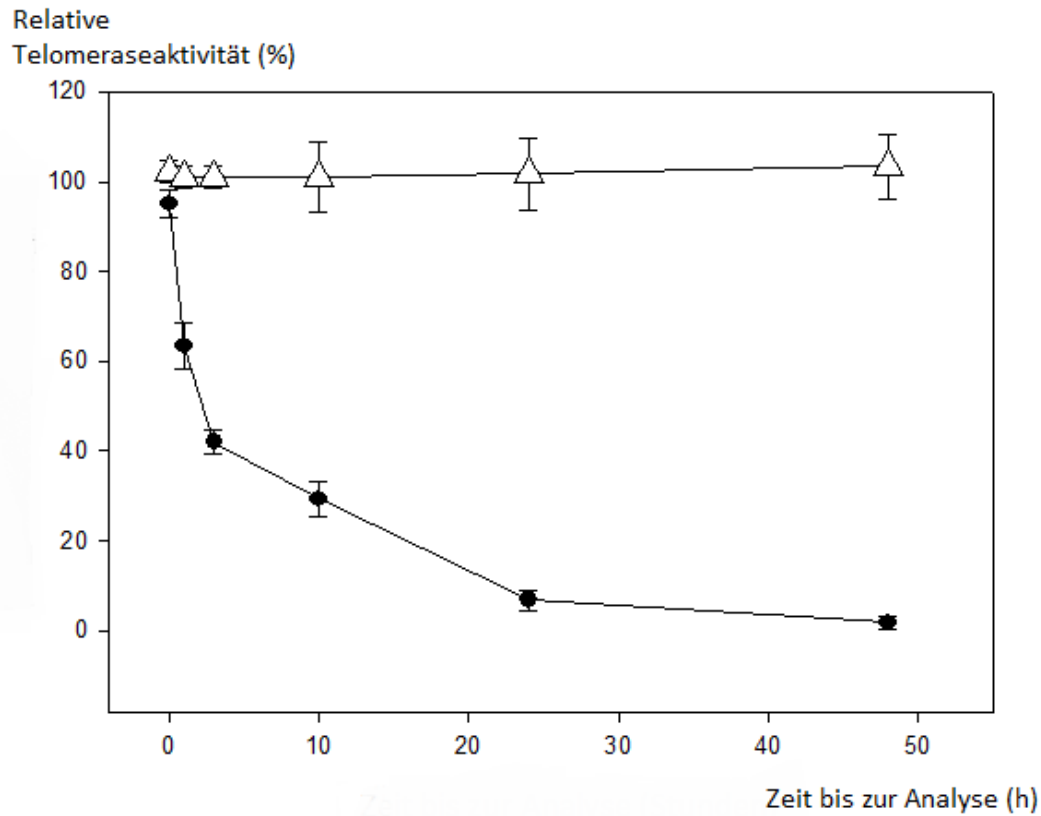


Abbildung 6: Stabilität der Telomeraseaktivität

Quelle: [ASSMANN et al. 2009]

● Relative Telomeraseaktivität von Proteinlysat bei Inkubation bei Raumtemperatur

△ Relative Telomeraseaktivität vitaler Zellen bei Inkubation bei Raumtemperatur

Boxplotgrenzen: 1. Und 3. Quartil entsprechen 25-75%; Nicht- Außreißer-Werte 10-90%:

6. Diskussion

Eine der schwerwiegendsten und limitierenden Komplikationen von Krebserkrankungen ist die Menigeosis neoplastica. Daher ist bei einer Liquorpleozytose von >4 Zellen/ μl eine zwingende Differenzierung zwischen malignem und benignem Prozess indiziert.

Zur Beurteilung der Pleozytose werden zytopathologische Präparate hergestellt, welche von einem Neuropathologen befundet werden. Es ist zu beachten, dass Tumorzellen mikroskopisch erkennbar sind, eine Differenzierung von benignen (entzündlichen) und malignen Leukozyten mikroskopisch jedoch sehr schwierig und aufgrund einer häufigen Begleitreaktion mit reaktiv entzündlich transformierten Lymphozyten, nicht immer eindeutig ist.

Unterstützt wird die zytopathologische Beurteilung durch zytochemische und immunzytochemische Verfahren, welche die Sensitivität der Liquordiagnostik erweitern.

Die Sensitivität der zytologischen Untersuchung zur Detektion eines malignen Prozesses ist von verschiedenen Faktoren abhängig. (Tumortyp, anatomische Lokalisation oder Abschilferung der Zellen in den Liquor). Eine maligne Diagnose kann zytopathologisch meist nur bei diffuser Infiltration der Leptomeningen durch maligne Zellen mit schlechtem Zellzusammenhang gestellt werden. Intraparenchymatöse Tumorzellen und solche, die im Extraduralraum gelegen sind und somit keine Infiltration der Leptomeningen vornehmen, sind eher unwahrscheinlich mittels Mikroskopie zu detektieren. [BINGER, JOHNSTON 1981]

Bisherige Verfahren mittels neuropathologischer und immunhistochemischer Verfahren sind sehr arbeits- und zeitaufwendig. Zudem steht nicht jeder

neurologischen Klinik ein Neuropathologe sowie ein spezifisches Labor zur Verfügung.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es an Hand von Telomeraseaktivitätsmessung im Liquor, ergänzend zur zytopathologischen Diagnostik, einen Routinelabormarker zu erheben und somit die Zeit bis zur Diagnosestellung zu verkürzen.

6.1 Messung der Telomeraseaktivität in Liquorproben

Dass generell eine Messung von Telomeraseaktivität verschiedener, insbesondere fortgeschrittener Tumorerkrankungen, in Körperflüssigkeiten und auch in Liquor möglich ist, legten bereits vorhergehende Studien dar. [HESS, HIGHSMITH 2002], [NIEH et al. 2005] Vorangegangene Arbeiten von KLEINSCHMIDT- DEMASTERS et al. 1998 zeigten bei insgesamt 281 Proben, einen hohen prozentualen Anteil von Telomeraseaktivität in zerebralen Primärtumoren, zerebraler Metastasen so wie bei meningealer Infiltration.

In der Arbeit von KLEINSCHMIDT- DEMASTERS et al. 1998 wurde das TRAP Protokoll von KIM et al. 1997 verwendet und auf ein herkömmliches PCR Verfahren angewandt. Im Gegensatz zu der von uns durchgeführten quantitativen Real-Time PCR ist eine herkömmliche PCR mit wesentlich größerem Aufwand behaftet und es benötigt ein relativ großes Probenvolumen von 3-4 ml, was zusammen betrachtet zur schnellen klinischen Diagnostik nicht als empfehlenswert zu sehen ist.

Die unterste Detektionsgrenze lag in unseren Versuchsreihen bei 8 von 1000 malignen Zellen. Dies ist vergleichbar mit der Arbeit von JAKUPCIAK et al. 2005, welcher anhand des RQ- Trap Protokolls 10 von 1000 A594 Zellen detektieren

konnte. Somit konnte bereits bei geringer Liquorpleozytose eine sehr sensitive Differenzierung erfolgen.

Mit oben genanntem RQ- TRAP- Assay konnten in unseren Versuchsreihen zur Detektion einer Meningeosis neoplastica eine Sensitivität von 100% (15 von 15 Proben) und eine Spezifität von 98,9% (95 von 96 Proben) erreicht werden. In Anbetracht des hohen positiven prädiktiven Wertes von 0,947 und eines negativ prädiktiven Wertes von 1, ist das Verfahren als Screening-Test für Meningeosis neoplastica für eine weitere klinische Prüfung am größeren Kollektiv geeignet.

In der Veröffentlichung von KLEINSCHMIDT- DE MASTER et al. 1998 wurde von einer Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 90% zur Detektion einer Meningeosis neoplastica berichtet. Zur Beurteilung der Telomeraseaktivität wurde jedoch eine herkömmliche Bestimmungsmethode, die sogenannte End-Time PCR mittels Gel-Elektrophorese verwendet. In unserer Versuchsreihe wurden die Messungen mittels Real-Time PCR (Lightcycler®-System) nach dem RQ-TRAP durchgeführt, welche im Vergleich zu der herkömmlichen ELISA-PCR eine höhere Sensitivität und Spezifität bietet. Zudem konnte aufgrund der Festlegung der Annealingtemperatur bei 60°C und der Entwicklung eines spezifischen Primers (ACX) die Bildung von Primer- Dimern deutlich reduziert und somit eine höhere Spezifität erzielt werden. [WEGE et al. 2003] Ein weiterer Vorteil der Real-Time PCR mittels Lightcycler®-System und dem RQ-TRAP, war eine deutlich verringerte Analysezeit im Vergleich zu einer ELISA-PCR. Die komplette Analysezeit betrug etwas weniger als vier Stunden, bei einer manuellen Bearbeitungszeit von 20 Minuten. Probenverunreinigungen oder Übertragungsfehler wurden durch das geschlossene Glaskapillarsystem und konsequente Trennung der Arbeitsbereiche sichergestellt.

Unsere Versuche zeigten eine Korrelation zwischen der gemessenen Telomeraseaktivität und der Anwesenheit von Tumorzellen im Liquor und sind mit den Studien von NIEH et al. 2005 und HESS 2002 vergleichbar, welche jedoch andere Körperflüssigkeiten (z.B. Pleuraerguss, Perikarderguss, Aszites, Bronchial lavage, Urin, Blasenspülung, Plasma) mit vorhandener Malignität untersuchen. Diese einfache und zeitsparende Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität könnte in der klinischen Routinediagnostik die Messung der Telomeraseaktivität als laborchemischen Parameter für maligne Zellen im Liquor, so wie gegebenenfalls auch in anderen Körperflüssigkeiten, ermöglichen. Zu beachten ist jedoch, dass sich Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit des zu analysierten Probenursprungs ändern kann, was sich in den Arbeiten von NIEH et al. 2005 und HESS 2002 widerspiegelt.

Derzeitige Untersuchungen zur Detektion einer Meningeosis neoplastica sind sehr zeitaufwendig oder zum Teil unspezifisch. So ist es einem erfahrenen Zytologen beispielsweise gut möglich epitheliale (neoplastische) Zellen im Liquor zu mikroskopieren, jedoch ist eine Unterscheidung einer entzündlichen oder neoplastischen Lymphozytose kaum möglich und sehr unspezifisch [BALHUIZEN et al. 1978]. Weitere Bestimmungen und chemische Analysen des Liquors lassen zumindest eine richtungsweisende Analyse zu, ob es sich um einen physiologischen Liquor oder einen pathologischen Prozess handelt. Somit werden bei Liquoranalysen zum Beispiel immer das Lactat und der Gesamtproteingehalt bestimmt, sowie eine isoelektrische Fokussierung zur Detektion oligoklonaler Banden durchgeführt, welche bei Erhöhung einen zuverlässigen Hinweis auf einen pathologischen Prozess bieten. Dennoch geben sie keine spezifische Aussage darüber, um welche Art Pathologie es sich nun letzten Endes handelt. Weitere Verfahren sind Immunzytochemische Verfahren und PCR, bei denen durch spezifische Markierungen von B- und T-Lymphozyten

registriert wird, ob die atypischen Zellformen nur einer Zellart angehören. Dies kann zur gezielten Diagnostik bei bekannten Neoplasien hilfreich sein und gibt einen Anhalt für Klonalität. Bei bekannten Neoplasien und positivem Ergebnis ist dies für eine Therapieentscheidung ausreichend. Dies ist jedoch bei unbekanntem Primarius nicht der Fall. [STRIK, PRÖMMEL 2010]

Herkömmliche PCR-Methoden können spezifische monoklonale Veränderungen detektieren. Ein klar positives Ergebnis stützt die zytologische Diagnostik, jedoch gibt es zur diagnostischen Sicherheit dieser Methode unterschiedliche Ergebnisse. FISHER et al. 2008 untersuchten die diagnostischen Methoden der Menigeosis neoplastica bei primären ZNS-Lymphomen und kamen zur Überzeugung, dass die PCR eher als komplementäre Methode angesehen werden sollte.

Auch bildgebende Diagnostik mittels MRT wird im Allgemeinen auf eine Sensitivität von 70% geschätzt. [FREILICH et al. 1997], [ZEISER et al. 2004] Kontrastmittelanreicherungen der Menigen können nicht sicher für eine Menigeosis neoplastica sprechen.

Im Vergleich zu allen bisher üblichen diagnostischen Methoden konnte eine schnelle, sensitive und vor allem spezifische Methode dargestellt werden, welche es ermöglicht die Telomeraseaktivität im Liquor bereits bei geringer Zellzahl (8 von 1000 telomerasepositive Zellen) als laborchemisch messbaren Parameter zur Detektion einer Menigeosis neoplastica zu etablieren. Innerhalb 4 Stunden ließ sich in unseren Versuchen ein aussagekräftiger Wert zur Differenzierung von benigner oder maligner Liquorpleozytose stellen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse könnte ein Einsatz in der klinischen Routinediagnostik durch kurze Analysezeit, ein geringes Probenvolumen und eine hohe Spezifität/Sensitivität der Telomeraseaktivität in Liquorproben etabliert werden. In weitere Versuchsreihen sollte klinisch die

Telomeraseaktivität unter anderem als Verlaufsparemeter unter Chemotherapie untersucht werden.

6.2 Messung der Telomeraseaktivität in Überständen

Die Messung der Telomeraseaktivität in Überständen anstatt Zelllysaten sollte die Analysezeit weiter verkürzen und das laborchemische Verfahren mit aufwendiger Proteinisolation, weiter vereinfachen. Hierzu liegen in der vorhandenen Literatur keine vergleichbaren Daten vor.

Eine fehlende Detektion von Telomeraseaktivität im Überstand der Patientenproben kann zum einen an der physiologischen Liquorzirkulation liegen, wobei der Liquor durch Resorption und Neubildung insgesamt 3 mal am Tag neugebildet wird [OSHER 1949], [BRODBELT, STOODLEY 2007], zum anderen daran, dass im Gegensatz zu den Zellen der Zellkultur, möglicherweise vitale Tumorzellen im Liquor nicht autolytisch sind. Andererseits muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Sensitivität unseres Analyseverfahrens gegebenenfalls nicht ausreichend war, um eine minimale Menge von Telomeraseaktivität im Liquorüberstand zu detektieren. Die unterste Dektionsgrenze lag bei 8 von 1000 Zellen, d.h. die Telomeraseaktivität aus weniger als 8 Zellen konnte potenziell nicht detektiert werden. Ein weiterer zu betrachtender Faktor könnte die schnelle Inaktivierung des Proteins außerhalb von Zellen sein, was ebenfalls gezeigt werden konnte (siehe Punkt 6.3). Auch in anderen Versuchsreihen [KLEINSCHMIDT- DEMASTER et al. 1998] wurde auf ein kurzes Zeitintervall zwischen Probenentnahme und Verarbeitung geachtet, um mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch vorzeitige Inaktivierung zu vermeiden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass prinzipiell eine Telomeraseaktivitätsmessung aus Zellkulturüberstand möglich ist, das

Verfahren der Überstandsanalyse für die klinische Diagnostik jedoch mit den hier angewandten Techniken nicht geeignet ist.

6.3 Stabilität der Telomerase während der Präanalytik

Im Hinblick auf mögliche Verwendung der Telomeraseaktivitätsmessung als diagnostischen Laborparameter, stelle sich die Frage über die Stabilität des Enzyms bei Raumtemperatur. Mit oben genannter Versuchsreihe sollte der klinische Alltag (Zeitverzögerung auf Stationsebene oder im Labor) simuliert werden. Dabei zeigte sich, dass die Telomeraseaktivität frischer Proteinisolate, innerhalb weniger Stunden deutlich abnahm, wohingegen bei Zellen nach Proteinisolation weiterhin eine konstante Telomeraseaktivität nachzuweisen war. Dies bedeutet, dass die Messung der Telomeraseaktivität aufgrund hoher Stabilität über 48 Stunden bei Raumtemperatur einfach in die klinische Diagnostik integrierbar ist. Im Gegensatz dazu sollte nach STRIK 2010 das Probenmaterial für eine histologische Untersuchung innerhalb einer Stunde im zytologischen Labor zur Aufbereitung vorliegen. Die Versuchsreihe wurde lediglich mit Zellkulturproben (HEK 293 Zellen) durchgeführt. Eine Verifizierung anhand von Liquorproben wäre vor klinischer Einführung durchzuführen.

7. Literaturverzeichnis

1. Assmann, G., Werner, C., Herrmann, M., Momber, D., Krenn, T., Lothschütz, D., Fischer, L., et al. (2009). Detection of Meningeosis neoplastica by real-time quantitation of telomerase activity. *Clinical chemistry and laboratory medicine CCLM FESCC*, 47(10), 1271-1276.
2. Balhuizen, J. C., Bots, G. T., Schaberg, A., & Bosman, F. T. (1978). Value of cerebrospinal fluid cytology for the diagnosis of malignancies in the central nervous system. *Journal Of Neurosurgery*, 48(5), 747-753.
3. Balm, M., & Hammack, J. (1996). Leptomeningeal carcinomatosis. Presenting features and prognostic factors. *Archives of Neurology*, 53(7), 626-632.
4. Bigner, S. H., & Johnston, W. W. (1981). The cytopathology of cerebrospinal fluid. II. Metastatic cancer, meningeal carcinomatosis and primary central nervous system neoplasms. *Acta Cytologica*, 25(5), 461-479.
5. Blackburn, E. H. (1994). Telomeres: no end in sight. *Cell*, 77(5), 621-623.
6. Blackburn, E. H. (2000). The end of the (DNA) line. *Nature Structural Biology*, 7(10), 847-850.
7. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., et al. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-52. AAAS. doi:10.1126/science.279.5349.349
8. Brodbelt, A., & Stoodley, M. (2007). CSF pathways: a review. *British Journal of Neurosurgery*, 21(5), 510-520. Informa UK Ltd UK. doi:10.1080/02688690701447420
9. Chamberlain, M. C. (2010). Leptomeningeal metastasis. *Current Opinion in Oncology*, 22(6), 665-674.
10. Chowdhary, S., & Chamberlain, M. (2005). Leptomeningeal metastases: current concepts and management guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network JNCCN*, 3(5), 693-703.
11. Dahse, R., Fiedler, W., & Ernst, G. (1997). Telomeres and telomerase. *Der Pathologe*, 18(6), 425-429.
12. Davis, A. J., & Siu, L. L. (2000). Telomerase: therapeutic potential in cancer. *Cancer Investigation*, 18(3), 269-277.
13. DeAngelis, L. M. (1998). Current diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis. *Journal of neurooncology*, 38(2-3), 245-252.
14. Emrich, T., Chang, S.-Y., Karl, G., Panzinger, B., & Santini, C. (2002). Quantitative detection of telomerase components by real-time, online RT-PCR analysis with the LightCycler. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj*, 191(4), 99-108.
15. J Feng, W Funk, S Wang, S Weinrich, A Avilion, C Chiu, R Adams, E Chang, R Allsopp, J Yu, E Al (1995)The RNA component of human telomerase *Science* 269 (5228) p. 1236-1241
16. Freilich, R. J., Krol, G., & DeAngelis, L. M. (1995). Neuroimaging and cerebrospinal fluid cytology in the diagnosis of leptomeningeal metastasis. *Annals of Neurology*, 38(1), 51-57.
17. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1), 59-74. Nature Publishing Group.

18. Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94(6), 695-698. Elsevier Ltd.
19. Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, 102(1), 1-4.
20. Greider, C W. (1996). Telomere length regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 337-365.
21. Greider, C W, & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43(2 Pt 1), 405-413. Cambridge, Mass.).
22. Greider, Carol W. (1998). Commentary Telomerase activity , cell proliferation , and cancer. *Molecular Biology*, 95(25), 90-92.
23. Grossman, S. A., Finkelstein, D. M., Ruckdeschel, J. C., Trump, D. L., Moynihan, T., & Ettinger, D. S. (1993). *Randomized prospective comparison of intraventricular methotrexate and thiotepa in patients with previously untreated neoplastic meningitis. Eastern Cooperative Oncology Group. Journal of Clinical Oncology* (Vol. 11, pp. 561-569).
24. Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V. L., Culhane, A. C., & Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*.
25. Harley, C. B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Research*, 256(2-6), 271-282.
26. Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-460. Nature Publishing Group.
27. Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636. Elsevier.
28. Hess, J. L., & Highsmith, W. E. (2002). Telomerase detection in body fluids. *Clinical Chemistry*, 48(1), 18-24.
29. Hiroyuki Seimiya, 1, 2, 3 Hiroko Sawada, 1 Yukiko Muramatsu, 1 Mayuko Shimizu, 1 Kumiko Ohko, 1 Kazuhiko Yamane, 1 and Takashi Tsuruo1, 4. (2000). Paper Telomerase primersequenz.
30. Hohaus, S., Voso, M. T., Orta-La Barbera, E., Cavallo, S., Bellacosa, A., Rutella, S., Rumi, C., et al. (1997). Telomerase activity in human hematopoietic progenitor cells. *Haematologica*, 82(3), 262-268.
31. Hou, M., Xu, D., Björkholm, M., & Gruber, A. (2001). Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clinical Chemistry*, 47(3), 519-524.
32. Hu, B. T., Lee, S. C., Marin, E., Ryan, D. H., & Insel, R. A. (1997). Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *The Journal of Immunology*, 159(3), 1068-1071.
33. Jakupciak, J. P., Barker, P. E., Wang, W., Srivastava, S., & Atha, D. H. (2005). Preparation and characterization of candidate reference materials for telomerase assays. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1443-1450.
34. Kim, N. W., & Wu, F. (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Research*, 25(13), 2595-2597.

35. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193), 2011-2015.
36. Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Evans, L. C., Bitter, M. A., Shroyer, A. L., & Shroyer, K. R. (1998). Part II. Telomerase expression in cerebrospinal fluid specimens as an adjunct to cytologic diagnosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 161(2), 124-134.
37. Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Hashizumi, T. L., Sze, C. I., Lillehei, K. O., Shroyer, A. L., & Shroyer, K. R. (1998). Telomerase expression shows differences across multiple regions of oligodendroglioma versus high grade astrocytomas but shows correlation with Mib-1 labelling. *Journal of Clinical Pathology*, 51(4), 284-293.
38. Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Shroyer, A. L., Hashizumi, T. L., Evans, L. C., Markham, N., Kindt, G., & Shroyer, K. R. (1998). Part I. Telomerase levels in human metastatic brain tumors show four-fold logarithmic variability but no correlation with tumor type or interval to patient demise. *Journal of the Neurological Sciences*, 161(2), 116-123.
39. Krupp, G., Kühne, K., Tamm, S., Klapper, W., Heidorn, K., Rott, a, & Parwaresch, R. (1997). Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust "TRAP" assay. *Nucleic acids research*, 25(4), 919-21.
40. Martens U und Lange W (2000) *Telomerase-Hemmung. Ein neues therapeutisches Konzept in der Onkologie?* *Arzneimitteltherapie* 18: 387-391
41. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., et al. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6622-6626..
42. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(Pt 1), 263-273.
43. Nakamura, T. M., & Cech, T. R. (1998). Reversing time: origin of telomerase. *Cell*, 92(5), 587-90. Cell Press.
44. Nieh, S., Chen, S.-F., Fu, E., Jan, C.-I., & Lee, W.-H. (2005). Detection of the human telomerase RNA component by in situ hybridization in cells from body fluids. *Acta Cytologica*, 49(1), 31-37.
45. Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), 181-190.
46. Osher, D. (1949). The cerebrospinal fluid; anatomy and physiology. *Cincinnati Journal of Medicine*, 30(7), 379. Elsevier Masson SAS.
47. Pavlidis, N. (2003). Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *European Journal of Cancer*, 39(14), 1990-2005.
48. Rutenber, E., Ready, M., & Robertus, J. D. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 24(6319), 227-241. Nature Publishing Group.
49. Schmittgen, T. D. (2001). Real-time quantitative PCR. *Methods*, 25, 75-83.
50. Shay, J W. (1997). Telomerase in human development and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 173(2), 266-70.
51. Shay, J W, & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), 787-791.

52. Shim, W. Y., Park, K. H., Jeung, H.-C., Kim, Y. T., Kim, T. S., Hyung, W. J., An, S. H., et al. (2005). Quantitative detection of telomerase activity by real-time TRAP assay in the body fluids of cancer patients. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(5), 857-863.
53. Shippen, D. E. (1993). Telomeres and telomerases. *Current opinion in genetics development*, 3(5), 759-763.
54. Strik, H., & Prömmel, P. (2010). Meningeosis neoplastica. *Der Nervenarzt*, 81(2), 229-242.
55. Technologies, A. R. R.-time P.-related, & Applications, T. (2008). Real-Time PCR for Systems
56. Thiel, E. & Gleissner, B. (2006). Menigeosis neoplastica. *Dtsch. Ärzteblatt*, 103(39): A-2559/ B-2216/ C-2137.
57. Transcriptase, O. R. (2004). May 2004 Omniscript® Reverse Transcription Handbook
58. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., & Lansdorp, P. M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9857-9860.
59. Wasserstrom, W. R., Glass, J. P., & Posner, J. B. (1982). Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. *Cancer*, 49(4), 759-72.
60. Wege, H., Chui, M. S., Le, H. T., Tran, J. M., & Zern, M. A. (2003). SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Research*, 31(2), e3.
61. Weng, N.-ping, Granger, L., & Hodes, R. J. (1997). Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10827-10832. National Academy of Sciences.
62. Widmann, Thomas A, Herrmann, M., Taha, N., König, J., & Pfreundschuh, M. (2007). *Short telomeres in aggressive non-Hodgkin's lymphoma as a risk factor in lymphomagenesis. Experimental Hematology* (Vol. 35, pp. 939-946).
63. Widmann, Thomas Alexander, Willmann, B., Pfreundschuh, M., & Beelen, D. W. (2005). Influence of telomere length on short-term recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 33(10), 1257-1261.
64. Thomas A Widmann, Markus Herrmann, Naim Taha, Jochem König, Michael Pfreundschuh in *Experimental Hematology* (2007) Short telomeres in aggressive non-Hodgkin's lymphoma as a risk factor in lymphomagenesis.
65. Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1), 130-131, 134-138. Elsevier.
66. Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., & Balis, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22(1), 176-181.
67. Witzany, G. (2008). The Viral Origins of Telomeres and Telomerases and their Important Role in Eukaryogenesis and Genome Maintenance. *Biosemitotics*, 1(2), 191-206. Springer.

68. Wright, W E, & Shay, J. W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature Medicine*, 6(8), 849-851.
69. Yi, X., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2001). Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4818-4825. Oxford University Press.
70. Zeiser, R., Burger, J. A., Bley, T. A., Windfuhr-Blum, M., Schulte-Mönting, J., & Behringer, D. M. (2004). Clinical follow-up indicates differential accuracy of magnetic resonance imaging and immunocytology of the cerebral spinal fluid for the diagnosis of neoplastic meningitis - a single centre experience. *British Journal of Haematology*, 124(6), 762-768.
71. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*, 32(12), e103. Oxford University Press.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Metaphasechromosoms mit Telomere

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Telomerase

Abbildung 3: Telomeraseaktivitätsmessung einer Verdünnungsreihe mit HEK 298- Zellen.

Abbildung 4: Darstellung der Standartkurve als logarythmische Beziehung von Zellzahl zu PCR- Produkt.

Abbildung 5: Telomeraseaktivitätsmessun aus Überständen verschiedener Zelllinien (n=5) aus Zellkultur.

Abbildung 6: Stabilität der Telomeraseaktivität

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Zelllinien der Versuchsreihen

Tabelle 2: Verdünnungsreihe

Tabelle 3: Ablauf der Lighcycler® PCR

Tabelle 4: Krankheitsbildern der Liquores

Tabelle 5: Vierfeldertafel der Versuchsreihen

9. Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|----------------|---|---|
| AK | - | Antikörper |
| ALL | - | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | - | Akute myeloische Leukämie |
| CML | - | Chronische myeloische Leukämie |
| °C | - | Grad Celsius |
| DLBCL | - | Diffus großzelliges B-Zell Lymphom |
| DNS | - | Desoxyribonukleinsäure |
| d.h. | - | das heißt |
| dt. | - | deutsch |
| EBV | - | Ebstein Barr Virus |
| g | - | Gramm |
| h | - | hour; dt.: Stunde |
| hTR | - | human telomerase RNA |
| hTERT | - | human telomerase reverse transcriptase |
| kD | - | Kilo Dalton |
| l | - | Liter |
| LED | - | Light emitting diode= Licht emittierende Diode |
| min | - | Minute |
| ml | - | Mililiter |
| µl | - | Mikroliter |
| n | - | Anzahl |
| NHL | - | Non Hodgkin Lymphom |
| nm | - | Nanometer |
| p | - | p- Wert; Signifikanzwert |
| PCR | - | Polymerase chain Reaction; dt.: Polymerase Kettenreaktion |
| qRT-PCR | - | quantitative Real-time PCR |
| R ² | - | Relativitätskoeffizient |
| rpm | - | revolutions per minute; dt.: Umdrehungen pro Minute |
| SAB | - | Subarachnoidal Blutung |
| sec | - | Sekunde |
| TP1 | - | telomerase- associated protein 1 |
| z.B. | - | Zum Beispiel |
| % | - | Prozent |

10. Danksagung

- Ich danke Herrn **Thomas Widmann** für das interessante Themas sowie die gute Betreuung und Führung durch die arbeitsintensive Phase im Labor und die fortwährende Motivation so wie Korrektur in der Schreibphase.
- Ein besonderer Dank geht an **meine Eltern**, die mich in allen Phasen stets unterstütz und zur Fertigstellung der Arbeit motiviert haben.
- **Willtrud und Ernst Christmann**, die mich während des Studiums immer unterstütz haben.
- **Natalie Fadle** für die Tatkräftige Unterstützung im Labor.
- **Natalie Motsch** für Übersetzungshilfen.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|------------------------------|
| Name | Dunja Klein (geb. Momber) |
| Familienstand | verheiratet |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Geburtsdaten: | 25. Juli 1982 in Saarbrücken |

Schulische Ausbildung/Studium

| | |
|---------------|--|
| 1988 bis 1992 | Grundschule Barbara Altenkessel |
| 1992 bis 1998 | Marie-Luise-Kaschnitz Gymnasium Völklingen |
| 1998 bis 2001 | Wirtschafts Wissenschaftliches Gymnasium Saarbrücken |

Hochschulbildung

| | |
|---------------|--|
| 2001 bis 2002 | HTW des Saarlandes |
| 2002 bis 2009 | Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes |

Abschlüsse

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Juni 2001 | Allgemeine Hochschulreife |
| Oktober/November 2009 | Ärztliche Prüfung (Examen) |

Berufliche Erfahrungen

| | |
|---------------------------------|---|
| Juli 2006 bis August 2008 | Studentischer Blutentnahmedienst CTS St. Theresia Rastpfuhl (Onkologie) |
| März 2010 bis April 2011 | Neurologie Knappschaftskrankenhaus Sulzbach |
| Mai 2011 bis Oktober 2011 | Neurologische Rehaklinik Bosenberg St. Wendel |
| November 2011 bis Dezember 2011 | Onkologie CTS St. Theresia Rastpfuhl, Saarbrücken |
| Januar 2012 bis heute | Neurologie Knappschaftskrankenhaus Sulzbach |